

論文内容の要旨

論文題目

Study on the subunit interactions within the *Chlamydomonas* flagellar spokehead
(クラミドモナス鞭毛軸系スポークヘッドにおけるタンパク質間相互作用の研究)

氏名 河野 崇宏

真核生物の鞭毛・繊毛運動は屈曲波の伝播という特徴的な運動を行う。その運動は、基本的には周辺微小管上の外腕ダイニンと内腕ダイニン群が隣接する微小管に対して滑り力を発生することにより実現されている。規則正しい波動運動を発生するために、そのダイニンの力発生過程は時間・空間的に厳密に制御されている必要がある。重要な制御の 1 つは、中心対微小管とラジアルスポークによる制御である。機構の実体はまだ多くが不明であるが、現在の一般的なモデルでは、ラジアルスポーク先端部（スポークヘッド）と中心対微小管が相互作用し、その情報がスポークを介して周辺微小管に伝わり、その結果、ダイニンの活性が調節されるものと想像されている。単細胞緑藻クラミドモナスの突然変異株で、中心対微小管やラジアルスポークを欠失したものはダイニン内腕の活性が低下し、運動性が失われている。

中心対微小管とラジアルスポークによる制御の機構の全貌はまだ不明であるとしても、スポークヘッドと中心対微小管の相互作用が非常に重要な役割を果たしていることは、疑問の余地がない。しかし、スポークのサブユニット構造についてはこれまでいくつかの研究が行われているものの、スポークヘッドの構造や性質については、約 30 年前にその構成タンパク質が同定されて以来、ほとんど何も明らかにされてこなかった。そこで本研究では、スポークヘッドを構成するタンパク質を組換えタンパク質として機能的に発現し、それら構成タンパク質間の相互作用を生化学的に解析することによってスポークヘッドの構

造への手がかりを得ることを目的とした

本論文は 2 部からなる。第 1 部では、全てのスポークヘッド構成タンパク質をクローニングして、大腸菌や培養細胞発現系を用いて発現した研究について述べる。一部については変異株に導入して変異形質をレスキューし、組み換えタンパク質が生理的機能を保持していることを検証した。

鞭毛軸糸ラジアルスポークヘッドはラジアルスポークプロテイン (RSP) 1、4、6、9、10 の 5 つのタンパク質から構成されており、本研究を開始した時点では、そのうち 4 と 6 がクローニング済みであった。本研究ではまず RSP1、9、10 のクローニングを行った。そのためにスポークヘッドを軸糸から生化学的に単離、精製して、各々のタンパク質のアミノ酸配列を解読し、データベース検索により遺伝子を同定した。このようにして得られた遺伝子の情報をもとに、それら 5 種のスポークヘッド構成タンパク質と、スポークヘッドの近傍にあると考えられている RSP2、5、23 の組換えタンパク質 (タグ配列を付加したもの) を作製した。また、その多くのタンパク質 (RSP1、9、10) に対する抗体を作製した。さらに、変異株の存在する RSP4、6、9 については、生理的活性を検定するため、得られた組換えタンパク質をエレクトロポレーションによるタンパク質導入法で各々を欠損するか異常を持つ変異株 *pf1*、*pf26*、*pf17* に直接導入し、それらの非運動性変異株の運動性が野生株レベルにまで回復することを観察した。したがって、少なくともこれらの組換えタンパク質が生理的活性を保持していることが示された。以前同様の方法によって、ダイニン内腕のサブユニットの生理活性を検定した例が報告されているが、スポーク構成タンパク質の組換え体において生理的活性が示されたのは、これがはじめてである。

第 2 部で述べる研究では、組換えタンパク質を用いたプルダウン実験、化学架橋実験、および組換えタンパク質同士の会合能の検定により、スポークヘッド構成タンパク質間の相互作用を明らかにすることを試みた。

まず、上記 5 種のスポークヘッド構成タンパク質と、先行研究によってスポークヘッド近傍に位置すると示唆されている 3 種のラジアルスポークタンパク質 (RSP2、5、23) の組換えタンパク質を作製し、相互に GST プルダウンアッセイを行った。その結果、64 通りの組み合わせのうち 10 の組み合わせで相互作用が検出された。また、軸糸中のスポークヘッドにおけるタンパク質間の相互作用を検出するため、軸糸を種々の化学架橋剤で処理し、電気泳動の後、各スポークヘッドサブユニットの抗体で架橋産物を解析した。その結果、プルダウンアッセイで検出されたタンパク質間相互作用の一部と、新たにスポーク本体のサブユニット 2 種 (RSP2、23) とスポークヘッドサブユニットとの相互作用が検出された。これらの実験によって、スポークヘッド内部でのタンパク質間相互作用と、スポークヘッドとスポークのストーク部分との間の結合に関する情報が得られた。その結果、はじめて、スポークヘッド構成タンパク質間相互作用のモデルを提案することが可能になった。

上記のサブユニット間相互作用の解析に加えて、スポークヘッドをサブユニットの組換えタンパク質から *in vitro* で再構成する試みを行った。5 つの組換えスポークヘッドタンパ

ク質を混合してからショ糖密度勾配遠心にかけてところ、RSP10を除く4種のタンパク質、RSP1、4、6、9が沈降係数約7Sの複合体を形成することがわかった。比較のため軸糸から生化学的に単離したスポークヘッドを同様にショ糖密度勾配遠心法で沈降させたところ、それらは約23Sと7Sの2種類の複合体を形成した。すなわち、組換えスポークヘッド構成タンパク質によって形成される複合体はこのうち小さい方の複合体とほぼ同じ大きさを持つことになる。軸糸から抽出されたスポークヘッドにはRSP10を含む全5種のタンパク質が含まれているという違いはあるが、この結果は、スポークヘッドの特定の一部が *in vitro* で再構成されうる可能性を示すものである。

ラジアルスポークは対称的形状をしており、その構成タンパク質のいくつかがホモ二量体形成に関わるドメインをもっている。そのことから、細胞内で作られたラジアルスポークの前駆的複合体が鞭毛先端部に輸送され、そこで2つ組み合わさってホモ二量体化し、最終的なラジアルスポーク複合体を形成する可能性が指摘されている。興味深いことに、組換えタンパク質を化学架橋剤で処理したところ、RSP10がホモ二量体を形成することが判明した。スポークヘッド自体も二量体として存在し、その構造をRSP10の二量体化が安定化させている可能性が考えられる。

以上のように、本研究では、全てのスポークヘッド構成タンパク質と3種のラジアルスポークタンパク質を組換え体として作製した。それらを用いた相互作用検定実験から、スポークヘッド構成タンパク質間の相互作用のモデルを提案することができた。また、それらの組換えタンパク質から、スポークヘッドの一部が *in vitro* で部分的に再構成される可能性を示した。これらの結果は今後スポークヘッドの機能を研究する上で重要であろう。